

(11)特許出願公開番号

特開平8-81497

(43)公開日 平成8年(1996)3月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/435		8318-4H		
A 6 1 K 38/00	A E D			
48/00				
			A 6 1 K 37/ 02	A E D
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		審査請求	未請求	請求項の数19
			OL	(全 18 頁)
				最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-177671

(22)出願日 平成7年(1995)7月13日

(31)優先権主張番号 P4424577. 7

(32)優先日 1994年7月13日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 590000145

ヘキスト・アクチェンゲゼルシャフト

ドイツ連邦共和国、65926 フランクフル

ト・アム・マイン (番地なし)

(72)発明者 ヘルマン、ケプゼル

ドイツ連邦共和国ビュルツブルク、エグロ

フシュタインシュトラーセ、 5

(72)発明者 ディルク、グリュンデマン

ドイツ連邦共和国ハイデルベルク、アドラ

ーシュトラセ、17

(72)発明者 バレンティン、ゴルボウレフ

ドイツ連邦共和国ビュルツブルク、オスト

プロイセンシュトラッセ、1

(74)代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 カチオン系生体異物および／または薬物の輸送を行う輸送タンパク質、それをコードするDNA、およびそれらの用途

(57) 【要約】

【課題】 肝臓上皮細胞、腎臓上皮細胞および腸細胞中に存在して、カチオン系薬物および／または生体異物を輸送することに関与する輸送タンパク質のクローニング。

【解決手段】 この輸送タンパク質はそのDNAおよびアミノ酸配列により具体的に記載されている。

1	CGAGCCCTGGCTAACTGGTGAAGGCGCTACCGACGCACTCCGACCGTGGATATGTCCT	MetProthrValAspAspValLeu
161	GGACCACTGGAGAGGTTTGCGCTGGTTCAGAAACACCCCTCTCTGTCCTGCTGCTGAT	
169	GlueValGlyLeuIlePheGlyTrpPheGlnGlnValPheLeuLeuLeuGluCysLeuLeu	
221	CTCAGCTCTTTACCTCCCAATCTATGTGGCAATCTCTCTCGCGCTCAACCCCTGACCA	
229	SerAlaSerLeuAlaProIleTrpValCylValPheLeuLeuGlyPheThrProGlyHis	
281	TTTTCGCGAGAACTCTGGGCTGCTAGCTGACCCAGCGGGTCTGCTGTGGAGCGGCGGA	
289	TyrCysGlnAsnProGlyValAlaIleGlnSerGlnArgTrpGlyTrpSerGlnAlaGlu	
341	GGAGCTGAACCTACACTGTGCTCGCGGGCTGGGACCTCTCGGACGAGGCGCTCTCTCGACCA	
349	GluLeuAlaIleThrValProGlyValLeuGlyProSerAspGluLeuLeuSerPheLeuSerGln	*
401	GTCGATCTGAGATGGAGCTAGTGAACAGCAGACGACTCTGACTCTGTCTGGACCGCACTGTC	
409	CysMetAlaGlyGluValGluAlaGlnGlnGlnSerThrLeuAspCysValAspProLeuSer	†
461	CAGCTCTGGTGGCCACACAGATCAGTGTGCATTTGGCGGCTCTCCGACGATGGCTGGGTATA	
469	SerLeuValAlaAlaAlaGlnSerGlnLeuProLeuGlyProCysGluIleGlyTrpValTyr	*
521	CGACACTCCGCGCTCTCTCAATCTCACTAGATTTAACTCTGGTGTGTGGAGCGCGCTGGAA	
529	AspThrProGlySerSerCylValThrGluPheAsnValCysGlyAspAlaThrGly	
581	ATGGGACCTTTTTCATCTGTGTGACATGTGGGCTCTCTCTCGCGCTCTCTGTTTCTGGG	
589	ValAspLeuPheGlnSerCysValAsnLeuLeuGlyPhePheLeuLeuValGly	
641	TTATCTCGGACAGAGGTTTGGGCTCAAGCTCTCTCTCTGGTAGACCGCTGGTCACTC	
649	TyrLeuAlaAspArgGlyGlyGluValGlnGluCysLeuLeuLeuLeuValThrSer	

【特許請求の範囲】

【請求項1】血液から肝臓上皮細胞または腎臓上皮細胞中にカチオン系生体異物および／または薬物を輸送するか、あるいは腸からカチオン系生体異物および／または薬物を輸送することに関与する輸送タンパク質であって、

図7～9、図10～12、または図13～15に示されたアミノ酸配列から選択される少くとも7つのアミノ酸の構成配列を示す輸送タンパク質。

【請求項2】図7～9、図10～12、または図13～15に示されたアミノ酸配列から選択される少くとも10のアミノ酸の構成配列を示す、請求項1に記載の輸送タンパク質。

【請求項3】図7～9、図10～12、または図13～15に示されたアミノ酸配列から選択される少くとも14のアミノ酸の構成配列を示す、請求項1に記載の輸送タンパク質。

【請求項4】図7～9、図10～12、または図13～15に示されたアミノ酸配列を示す、請求項1に記載の輸送タンパク質。

【請求項5】請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質をコードするDNA配列。

【請求項6】図7～9、図10～12、または図13～15に示されたDNA配列から少くとも21の塩基の構成配列を示す、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項7】図7～9、図10～12、または図13～15に示されたDNA配列から少くとも30の塩基の構成配列を示す、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項8】図7～9、図10～12または図13～15に示されたDNA配列から少くとも42の塩基の構成配列を示す、請求項5に記載のDNA配列。

【請求項9】請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質を常に発現する上皮細胞系を調製するための、請求項5～8のいずれか一項に記載のDNA配列の使用。

【請求項10】請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質を常に発現する上皮細胞系。

【請求項11】予想されるカチオン系薬物および／または生体異物の腎臓および胆汁排出と腸吸収のインビトロ試験に用いられる、請求項10に記載の上皮細胞系。

【請求項12】請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質と相同的な輸送タンパク質を単離するための、請求項5～8のいずれか一項に記載のDNA配列の使用。

【請求項13】単離がポリメラーゼ連鎖反応法を用いて行われる、請求項12に記載の使用。

【請求項14】腎臓および胆汁排出または腸吸収を変えるために薬物のような生物活性化合物に結合できるカチオン系シグナル分子を開発するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質および／または請

求項10または11に記載の上皮細胞系の使用。

【請求項15】カチオン系薬物および／または生体異物の腎毒性を減少させるために尿細管細胞中への薬物の取込みを阻止する上で使用できる抗体を開発するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質および／または請求項10または11に記載の上皮細胞系の使用。

【請求項16】カチオン系薬物の腎毒性を減少させるために尿細管細胞中への他の薬物および／または生体異物の取込みを阻止する上で使用できる特異的薬物を開発するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の輸送タンパク質および／または請求項10または11に記載の上皮細胞系の使用。

【請求項17】カチオン系薬物の腎毒性を減少させるために尿細管細胞中への薬物および／または生体異物の取込みを阻止する上で使用できるアンチセンスヌクレオチド配列を開発するための、請求項5～8のいずれか一項に記載のDNA配列の使用。

【請求項18】腎臓および胆汁カチオン排出メカニズムにおいて遺伝子レベルで分子欠陥を診断するための分子試験キットのための、請求項5～8のいずれか一項に記載のDNA配列の使用。

【請求項19】分子試験キットがポリメラーゼ連鎖反応法を行う上で必要な要素を含んでなる、請求項18に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】哺乳動物、特にヒトにおいて、様々な分子構造のカチオン系薬物および生体異物、更にカテコールアミンや他の内因性カチオンは、管腔および基底外側原形質膜に存在する多特異性輸送タンパク質により、腎臓および肝臓によって排出される。これらの輸送タンパク質は、神経原形質膜およびシナプス小胞中の既知モノアミン輸送タンパク質と、疎水性薬物を輸送するATP依存性タンパク質（多剤輸送タンパク質）とは、それらの機能の点で異なる。

【0002】本発明の範囲内において、相補的DNA配列がラット腎臓から最初に単離されたが、その配列は長さが556アミノ酸の膜タンパク質をコードしており、以下でOCT1と呼ぶこととする。この輸送タンパク質は近位尿細管の基底外側膜および肝細胞で様々な標的分子のカチオン輸送体として作用する。

【0003】OCT1と命名された輸送タンパク質はいかなる他の既知タンパク質とも相同的ではなく、疎水性および負荷電アミノ酸のこれまでにない独特な分布を示し、もっぱら腎臓、肝臓および腸でみられる。OCT1輸送タンパク質は様々な構造のカチオンを輸送し、異なる疎水性の多数のカチオン系物質により阻害され、非常に疎水性の物質だけを輸送できる既知多特異性輸送タンパク質（多剤輸送体）の場合とは異なる機能的性質を有

3

する。輸送タンパク質OCT1は哺乳動物で多特異性輸送タンパク質の新規原型として考えられる。

【0004】抗ヒスタミン剤、抗不整脈剤、鎮静剤、オピエート、利尿剤、静細胞剤および抗生物質のような汎用薬物を含めた多数の有機カチオンは、腎臓上皮細胞および肝細胞から能動輸送されることで尿および胆汁中に排出される。腎臓で能動的に分泌されたとき、カチオンは近位尿細管の基底外側および管腔原形質膜で多特異性輸送系により輸送される。2つの系はそれらの機能的に異なる。基底外側膜の輸送タンパク質は、テトラエチルアンモニウム (TEA)、N¹-メチルニコチンアミド (NMN) およびN-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP) のような構造的に異なるカチオンを輸送することができるが、異なる構造の多数の細胞外カチオンにより阻害される。これらの輸送タンパク質は内部が負の膜電位と細胞内基質の反対方向輸送により駆動させることができる。外部方向プロトン勾配により駆動されるが、膜電位により影響されない、2つの輸送系が管腔膜において報告されている。これら輸送系のうち1つは近位尿細管の基底外側膜におけるカチオン輸送系の場合に匹敵する広い基質特異性を有している。機能的類似性のために、管腔膜のこの多特異性輸送系は心臓におけるノルアドレナリンの神経外輸送系と同一であると思われる。

【0005】

【発明の具体的説明】したがって、本発明は、血液から肝臓または腎臓の上皮細胞中にカチオン系生体異物および/または薬物を輸送するか、あるいは腸から血液循環中にカチオン系生体異物または薬物を輸送することに関する輸送タンパク質に関する。

【0006】新規輸送タンパク質は、図7~9、図10~12、および図13~15に示されたアミノ酸配列から選択される、少なくとも7つのアミノ酸の構成配列を示す。好ましい態様において、図7~9、図10~12、および図13~15からの構成配列は、少なくとも10のアミノ酸の長さ、特に好ましい態様において少なくとも14のアミノ酸の長さを有する。

【0007】本発明は、新規輸送タンパク質をコードするDNA配列にも関する。新規DNA配列は図7~9、図10~12、および図13~15に示された配列から選択される、少なくとも21の塩基の構成配列を示す。特に好ましい態様において、構成配列は少なくとも30の塩基の長さ、非常に特に好ましい態様において少なくとも42の塩基の長さを有する。

【0008】新規輸送タンパク質およびDNA配列は、医学的および薬理学的研究で特に重要である。新規DNA配列は、例えば新規輸送タンパク質を永続的に発現する上皮細胞系を作るために使用できる。この目的のため、輸送タンパク質をコードするDNA配列はそれ自体公知の遺伝子操作方法を用いて適切なベクター中に組み

4

込まれ、これが輸送タンパク質を以前発現しなかった適切な上皮細胞系を形質転換するために用いられる。こうして、新規輸送タンパク質を常に発現する細胞系が得られる。

【0009】輸送タンパク質を発現するような性質の上皮細胞系は、予想されるカチオン系薬物および/または生体異物の腎臓および胆汁排出と更に腸吸収を試験するためにインビトロで用いることができる。このため、このような細胞系は、薬物と更に他の生物活性化合物が腸から血液循環中に排出または吸収されるかどうか、そうであるとすればその程度について、入念な動物実験なしに、インビトロ段階で調べるために使用できる。

【0010】新規DNA配列は、新規輸送タンパク質と相同的な輸送タンパク質を単離するために用いることができる。したがって、本発明による輸送タンパク質と相同的な対応輸送タンパク質は、すべての哺乳動物種およびヒトから単離できる。2つの対応ヒト配列が既に決定されている。このような単離を行う1つの可能な手段は、現在周知のポリメラーゼ連鎖反応法を用いることである。これをするためには、ポリメラーゼ連鎖反応法用のプライマーとしての図7~9、図10~12、および図13~15に示された配列から適切なDNA配列を選択することが必要となる。これらのプライマーは相同的輸送タンパク質を単離する上で特に困難性なく使用できる。

【0011】新規輸送タンパク質および/または新規上皮細胞系の更に可能な使用法は、腎臓および胆汁排出または腸吸収を変えるために、薬物のような生物活性化合物に結合できるカチオン系シグナル分子の開発を行うために用いることである。こうして、異なる化学構造について試験を行い、それらが結合する分子の腎臓または肝臓からの排出を有利にして、しかも腸から血液循環中への吸収を促進するかどうか、あるいはそれらが各場合に反対の作用を生じるかどうかについてみることができる。

【0012】新規輸送タンパク質は、カチオン系薬物の腎毒性を減少させるために、尿細管細胞中への薬物の取込みを阻止する上で使用できる抗体、特にモノクローナル抗体を作る上で特に使用できる。

【0013】更に、本発明の開示は、ある他のカチオン系薬物および/または生体異物の排出に影響を与える特異的薬物を開発する上で基礎として使用できる。こうして、他の活性化合物の取込みに影響を与えうる薬理活性物質を開発することができる。この性質の影響は、腸からの活性化合物の取込みを促進または防止するか、あるいは腎臓および肝臓で活性化合物の排出を促進または防止することからなる。

【0014】新規DNA配列の更なる好ましい使用法は、アンチセンスヌクレオチド配列を開発する場合であ

る。この関係において、対応する天然相補的ヌクレオチド配列と結合することで対応遺伝子の転写および／または翻訳を防止するヌクレオチド配列が開発できる。

【0015】新規DNA配列の更なる好ましい使用法は、腎臓および／または胆汁カチオン排出メカニズムにおいてゲノムレベルで分子欠陥を診断するための分子試験キットにおけるそれらの使用である。この性質の分子試験キットにおいて、DNA配列は特に好ましい態様でポリメラーゼ連鎖反応法を行うために使用できる。この場合に、公知のDNA配列は、カチオン輸送体をコードする各患者からの遺伝子を増幅させて、この遺伝子を遺伝子変異について調べるために、ポリメラーゼ連鎖反応法において使用できるプライマー配列を選択および合成する上で基礎として用いられる。

【0016】

【実施例】本発明は下記例を参照して更に詳細に説明されるが、しかしながらそれは発明を制限するためではない。

【0017】例1

輸送タンパク質をコードする遺伝子をクローニングするために、平滑末端化二本鎖cDNAを、第一鎖を合成するためのNotIオリゴ(dT)プライマーを用いてラット腎臓ポリ(A)+RNAから最初に調製した。SP6 RNAポリメラーゼプロモーターを含むEcoRIアダプターがcDNAに結合された後、後者をNotIで切断し、得られた断片を大きさで分別し(1.5~2.3kb)、ベクターpBluescript(Stratagene)のEcoRI制限部位に挿入した。次いで組換えベクターを大腸菌株DH10B中にエレクトロポレーションした。プラスミドDNAを形質転換株のプールから単離し、NotIで直鎖化し、SP6 RNAポリメラーゼを用いて転写した。

【0018】cRNAをポリ(A)+選択により精製し、卵母細胞当たり20~40ngの濃度で注入した。卵母細胞をインキュベートし、NMN阻害性¹⁴C-TEA取込みを測定した。標的化スクリーニング法を用いて、腎臓カチオン輸送体をコードする遺伝子を含んだ単クローンを遺伝子ライブラリーから単離した。用いた方法を最適化および部分的に修正した後にのみ、このクローンを単離することができた。同定されたDNAを配列決定するために、OCT1の重複制限断片をサブクローニングし、双方の鎖で完全に配列決定した。

【0019】ラット腎臓遺伝子バンクから単離された、鎖長1882塩基対のcDNA断片からなるOCT1遺伝子を、*Xenopus laevis*卵母細胞で発現させた。この目的のため、卵母細胞を5mM Hepes-Tris 緩衝液、pH 7.5、110mM NaCl、3mM KCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂ (以下でORIと称される)中で3日間、RNA注入後にインキュベートした。輸送はORI(22℃)に溶解された¹⁴C-TEA(テトラエチル

アンモニウム)と共に卵母細胞をインキュベートすることにより測定した。更に、実験は異なる濃度のNa⁺およびK⁺を用いて、実験中Ba⁺⁺の存在はそのまま、異なるpH値および異なる阻害剤の存在下で行った。用いられた¹⁴C-TEA濃度において、発現されたOCT1タンパク質により生じる取込みは90分間以上にわたりORI緩衝液で直線的であったため、取込み率は90分間のインキュベート後に決定した。測定を異なる濃度のNa⁺、K⁺およびH⁺で阻害剤の存在下において行ったとき、卵母細胞は最初に適切な緩衝液条件下で30分間インキュベートし、取込み率を¹⁴C-TEAと30分間のインキュベート中に決定した。¹⁴C-TEAとインキュベート後、取込みを止め、卵母細胞を洗浄し、それらが取り込んだ放射能の量について調べた。

【0020】こうして、1882塩基対cDNA断片を(前記のように)*Xenopus laevis*卵母細胞を用いて発現させた。こうして発現されたOCT1タンパク質は、NMN(N¹-メチルニコチンアミド)が阻害できる¹⁴C-テトラエチルアンモニウム(¹⁴C-TEA)の取込みを誘導し、その取込みは卵母細胞に水を注入したコントロールで得られる値の250倍以上であった。結果は図1にグラフ化されている。

【0021】クローン化OCT1 cDNAは、556アミノ酸を有する膜タンパク質をコードするオープン読取枠を含んでいる。アミノ酸配列は図7~9に示されている。それはデータバンクのタンパク質と類似性を示さない。

【0022】¹⁴C-TEA取込みの発現は、注入されたOCT1 cRNAの量に依存していた。これらの結果は図2に示されている。発現された取込みのcRNA依存性はn=約2であるHill式により記載することができる。

【0023】OCT1輸送タンパク質により示される¹⁴C-TEA取込みの基質依存性は、Michaelis-Menten式に従った。これらの結果は図3に示されている。95±μMの評価Km値は、初期実験で決定されたラット近位尿細管の基底外側膜からのカチオン輸送に関するKm値(160μM)と似ていた。それはラット近位尿細管の刷子縁膜における多特異性H⁺カチオン対向輸送体に関する大体のKm値の1/14であった。

【0024】例2

加えて、OCT1輸送タンパク質が基底外側膜の電位依存性多特異性カチオン輸送系または刷子縁膜の電位依存性多特異性H⁺カチオン対向輸送系を表すかどうかについて確定するために、OCT1輸送タンパク質による取込みが膜電位または膜全体のタンパク質勾配に依存しているかどうかを調べる試験を行った。発現される¹⁴C-TEA取込みを阻害する異なる阻害剤の能力も研究した。

【0025】図4および5は、OCT1輸送タンパク質

により媒介される¹⁴C-TEAの取込みが膜電位に依存しているが、pH単位で1の内部方向または外部方向タンパク質勾配が適用されたときにさほど変わらないことを明らかにしている。したがって、OCT1輸送タンパク質は近位尿細管の基底外側膜全体で測定されたカチオン輸送と同様の基本的特徴を有している。

【0026】図6および表1は、OCT1による¹⁴C-TEAの取込みが異なる分子構造の有機カチオンにより阻害されることを明らかにしている。これらの構造に*

*は、キニン、デシプラミン、プロカインアミドおよびO-メチルイソプレナリンのようないくつかの汎用薬物がある。評価K_i値は1-エチル-2-[(1,4-ジメチル-2-フェニル-6-ピリジニリデン)メチル]キノリニウムクロリド(シアニン863)の0.13μMとテトラメチルアンモニウム(TMA)の1mMとの間である。

【0027】

【表1】

阻害剤	K _i (μM)
シアニン863	0.13±0.02
デシニウム22	0.36±0.08
テトラベンチルアンモニウム	0.43±0.09
キニン	0.93±0.08
デシプラミン	2.8±0.6
メビペルフェニドール	5.2±0.3
プロカインアミド	13±2
1-メチル-4-フェニルピリジニウム	13±2
コルチコステロン	>10
レセルピン	>20
O-メチルイソプレナリン	43±5
テトラメチルアンモニウム	1000±100
N ¹ -メチルニコチンアミド	1000±200

【0028】表1は、OCT1腎臓輸送タンパク質のcRNAを注入した*Xenopus laevis*卵母細胞における¹⁴C-TEA取込みの感受性を示している。

【0029】阻害実験を行うとき、*Xenopus laevis*卵母細胞にOCT1 cRNA 5ngを注入し、表1で示された阻害剤の5~8つの異なる濃度の効果を卵母細胞中95μM取込みで測定した。その値も図6に示されている。阻害曲線を非直線回帰分析により適合させ、K_i値(±SD)を決定した。

【0030】既知多特異性輸送タンパク質とは対照的に、疎水性物質のみにより阻害されるいわゆる多剤輸送体、新規OCT1輸送タンパク質はTMAおよびNMNのような親水性化合物によっても阻害された。デシプラミンは、神経細胞の原形質膜で神経ノルアドレナリン輸送を阻害する場合よりも700倍大きなK_i値で、OCT1による輸送を阻害した。5μMレセルピンはOCT1誘導輸送に効果を有しないが、シナプス小胞の神経モノアミン輸送タンパク質はナノモル濃度以下のレセルピンで阻害される。

【0031】例3

OCT1輸送タンパク質は、膜小胞および培養腎臓上皮細胞を用いた測定から既に得られた機能データとOCT1 K_i値を比較することにより、基底外側カチオン系

輸送タンパク質と同一であることを確認することができた。このような比較をする上では、カチオン輸送における種依存性差異と、カチオン輸送の阻害を測定するための異なる方法の方法論的制限に関する考慮が払われねばならない。以前の研究において、ラット腎臓におけるカチオン輸送は短いインキュベーション時間(4秒間)を用いて行われねばならないミクロ灌流実験により調べた。高親和性阻害剤に関する拡散非依存性K_i値を調べるためにこの方法を用いることはできないため、我々は低親和性阻害剤を比較することに制限した。低親和性阻害剤TMAおよびNMNの比較において、我々はOCT1発現輸送タンパク質のK_i値(約1mM)がラット近位尿細管中へのTEAの基底外側取込みに関して測定されたK_i値(TMA 1.4mMおよびNMN 0.54mM)に相当することを発見した。それらはTEAの管腔取込みに関して測定されたK_i値(TMA 70mMおよびNMN 8.3mM)と明らかに異なる。

【0032】例4

OCT1の基底外側存在に関する追加的支持は、1,1'-ジエチル-2,2'-シアニンヨージド(デシニウム22)によるOCT1誘導性取込みの阻害に関して得られたK_i値(0.4μM)により与えられた。LLC-PK1細胞において、5.6nMのK_i値が管腔膜を

9

通るTEAの輸送に関して測定され、一方基底外側膜を通るTEAの輸送に関する K_i 値は $>0.1 \mu\text{M}$ であると評価された。OCT1輸送タンパク質を更に特徴付けるために、TEAよりも約10倍多い親和性を有するMPPも同様にOCT1により輸送されるかどうかについて調べる試験を行った。卵母細胞中へのOCT1 cRNA 8 ngの注入後、 ^3H -MPPの特異的取込みが発現されたが、これはキニンで阻害された。 ^{14}C -TEA ($148 \pm 4 \text{ pmol} \times \text{卵母細胞}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) および ^3H -MPP ($97 \pm 5 \text{ pmol} \times \text{卵母細胞}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) の発現取込みに関する同様の V_{max} 値も卵母細胞のサンプルで調べた。肝臓細胞中における多特異性カチオン輸送体の存在が報告されている。培養肝細胞中へのMPPの取込みが最近測定された。この関係において、OCT1により発現されるカチオン輸送を阻害する同様の阻害剤を用いてMPP取込みの約90%を阻害できることがわかった。肝細胞でMPP取込みについて調べられた K_i 値 (O-メチルイソプレナリン $78 \mu\text{M}$, MPP $13 \mu\text{M}$, キニン $0.8 \mu\text{M}$, デシニウム $230.23 \mu\text{M}$ およびシアニン $8630.10 \mu\text{M}$) は、*Xenopus* 卵母細胞により発現されたOCT1タンパク質によるTEAの取込みについて得られた値と事実上同一であった。これらのデータは、OCT1輸送タンパク質または高度に相同的な輸送タンパク質が肝細胞の原形質膜に存在することを示唆している。

【0033】例5

OCT1のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は図7~9に示されている。Kozak タイプ (ACGCCATG) の停止コドンおよび翻訳開始部位はオープン読取枠の上流にみられる。

【0034】OCT1の親水性/疎水性の分析から、膜をおそらく横断している11の疎水性 α -ヘリックス領域を確認した。疎水性/親水性インデックスは図16に示されている。推定膜貫通領域は長さ17~27アミノ酸である。それらは1つの長い、2つの中間長さおよび7つの短い親水性領域で互いに結合されている。3つの潜在的N-グリコシル化部位が最初の2つの膜横断タンパク質領域間にある親水性領域で予想されたため、図17に示されたOCT1の向きが提案された。第一の親水性領域は14の負荷電アミノ酸を含んでおり、OCT1のカチオンの結合にとり重要である。

【0035】例6

様々なラット組織および一部の細胞系を、いわゆるノーザンブロットを用いて、OCT1輸送タンパク質特異性mRNAの局在性について分析した。この目的のため、全RNAをグアニジニウム/フェノール/クロロホルム法により単離し、mRNAをオリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィーにより精製した。mRNAをホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動により分別し、Eybond-N膜(Amersham)に移し、その後ハイブリッド形成

10

させた。このために、ラット細胞および細胞系293からのmRNA $5 \mu\text{g}$ と細胞系Caki-1およびLLC-PK1からのmRNA $1.5 \mu\text{g}$ をホルムアルデヒドアガロースゲル上にのせた。ハイブリッド形成はプラスミドpOCT1からの新たなDNA配列の ^{32}P -標識cDNA断片を用いて行った(ヌクレオチド285~1196を用いた)。ハイブリッド形成はハイブリッド用溶液(50%ホルムアミド、5×SSPE、5×Denhardt's溶液、0.5% SDSおよびサケ精子DNA $20 \mu\text{g}$) 中42℃で18時間行った。膜を60℃で0.25×SSPE、0.1% SDSの最終厳密さまで数工程で洗浄した。細胞系LLC-PK1に関する結果を示すために、フィルムを24時間暴露し、フィルムを他のトラックについて6時間暴露した。RNA標準(GIBCO/BRLから0.14~9.5キロ塩基範囲)を用いて、RNA断片のサイズを調べた。そのサイズは図18に示されている。

【0036】ノーザンブロット分析から得られたオートラジオグラフは図18に示されている。1.9キロ塩基の明確なバンドと3.4および4.8キロ塩基の追加バンドが腎皮質、腎髄質、肝臓および腸の場合で観察された。細胞系LLC-PK1において、ハイブリッド形成は3.4キロ塩基領域のみで観察された。逆に、OCT1シグナルは腎乳頭、骨格筋、心筋、脳またはヒト胚芽腎細胞系293とCaki-1細胞で観察された。心臓およびCaki-1細胞は管腔腎臓膜の H^+ カチオン対向輸送タンパク質とおそらく同一である神経外ノルアドレナリン輸送タンパク質を含んでいるため、近位尿細管の基底外側および管腔膜にあるカチオン輸送タンパク質は異なる遺伝子ファミリーに属するらしい。その場のハイブリッド形成では、OCT1輸送タンパク質が近位尿細管、肝臓の上皮細胞および小腸の腸細胞で発現されることを示した。

【0037】上記例は、腎臓および肝臓からカチオン系薬物を除去する上で重要な役割を果たす新規で独特なタンパク質がクローニングされたことを証明している。このタンパク質はおそらく腸からのカチオン系化合物の吸収にも関与している。カチオン輸送および薬物の排出は30年以上も研究されてきたが、過去の進歩はわずかであった。これに関する理由は、肝臓および腎臓からの薬物の排出が上皮細胞の基底外側および管腔原形質膜を通る輸送を含み、これらの輸送プロセスが機能的に異なるカチオン輸送タンパク質により起こるためである。これに加えて、同様の基質特異性を有する異なるカチオン輸送タンパク質が管腔および基底外側腎臓膜双方に存在する可能性が排除しえないからである。カチオン輸送タンパク質の1つのタイプが新規OCT1輸送タンパク質をクローニングした結果として確認された。これはカチオン系薬物の排出に関する以後の研究のために多くの選択肢を与えるものである。

【0038】例7

本出願に記載された技術を用いて、OCT1と相同的な2つのヒト遺伝子をクローニングして、それらを完全にまたは部分的に配列決定できることが各々わかった。完全に配列決定された遺伝子(HOCT1)は1885塩基からなり、553アミノ酸のタンパク質をコードしている。それは図10~12に示されている。CT1およびHOCT1のアミノ酸間には78%の同一率がある。第二のヒト遺伝子(HOCT2)は1896塩基からなり、555アミノ酸のタンパク質をコードしている。OCT2のヌクレオチド配列および演繹されたアミノ酸配列は図13~15に示されている。OCT1およびHOCT2のアミノ酸間には68%の同一率がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1~6はXenopus laevis卵母細胞におけるOCT1の発現について示している。示された ^{14}C -TEA取込み率は10~20回測定の平均値±標準偏差を表す。図1は水、ラット腎臓mRNA 20ngまたはOCT1 cRNA 10ng注入後に観察された ^{14}C -TEAのNMN阻害取込みの比較について示している。インキュベート培地中 ^{14}C -TEAおよびNMNの濃度は、各々200 μM および10 mMであった。

【図2】異なる量のOCT1 cRNA注入後200 μM ^{14}C -TEAの取込み率について示している。曲線は得られたデータにHill式を適合させた後コンピューター計算した($n=1.9 \pm 0.2$)。

【図3】卵母細胞当たりOCT1 cRNA 3ngの注入後に発現された ^{14}C -TEA取込みの基質依存性について示している。連続線は水を注入したコントロール卵母細胞で測定された飽和性成分および直線的成分を含む取込みについて示している。直線的成分は直線的回帰により適合させた(点線、 $30 \text{ fmol} \times \text{h}^{-1} \times \text{卵母細胞}^{-1} \times \mu\text{M}^{-1}$)。飽和性成分はMichaelis-Menten式を用いて適合させた($K_m 95 \pm 10 \mu\text{M}$, $V_{max} 81 \pm 5 \text{ pmol} \times \text{h}^{-1} \times \text{卵母細胞}^{-1}$)。実線は双方の成分を含んだ式に合わせることでコンピューター計算した。

【図4】OCT1 cRNA 3ngを注入した卵母細胞における ^{14}C -TEA取込みの電位依存性について示している。95 μM ^{14}C -TEAの取込みを所定濃度の Na^+ 、 K^+ および Ba^{++} の存在下で測定した。これらの条件下において、膜電位は-40~-60 mV (100 mM Na^+ および3 mM K^+)、0~-10 mV (1 mM Na^+ および102 mM K^+)および-18~-22 mV (100 mM Na^+ 、3 mM K^+ および10 mM Ba^{++})であった。

【図5】OCT1 cRNA 3ngを注入した卵母細胞中プロトン勾配の存在および不在における95 μM ^{14}C -TEAの取込みについて示している。 ^{14}C -TEAの取込みを変える膜電位のプロトン勾配誘導性変化を妨げるために、測定をインキュベート培地中102 mM K^+ および1 mM Na^+ の存在下で行った。これにより、膜電位は約0 mVになった。微小電極を用いたpH測定では、pHが30分の取込み時間中0.1単位以下で変化することを示した。

【図6】デシニウム22 (○)、キニン(Δ)、デシブ
ラミン(□)、プロカインアミド(黒丸)、O-メチル
イソプレナリン(◇)およびテトラメチルアンモニウム
(黒ひし形)によるOCT1誘導性 ^{14}C -TEA取込み
の阻害について示している。卵母細胞にOCT1 cR
NA 5ngを注入し、95 μM ^{14}C -TEAを用いて測定
を行った。

【図7】OCT1のヌクレオチド配列とそれから演繹さ
れたアミノ酸配列について示している。推定貫膜領域に
は下線がひかれ、NXT/Sタイプの潜在的N-グリコ
シル化部位は星印で示されている。

【図8】図7の配列の続きである。

【図9】図8の配列の続きである。

【図10】相同的なヒト腎臓遺伝子(HOCT1)のヌク
レオチドおよびアミノ酸配列について示している。示さ
れた遺伝子断片は1885塩基を含み、553アミノ酸
をコードする。

【図11】図10の配列の続きである。

【図12】図11の配列の続きである。

【図13】第二の相同的なヒト腎臓遺伝子(HOCT2)
のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列について示して
いる。示された遺伝子断片は1856塩基を含み、55
5アミノ酸をコードする。

【図14】図13の配列の続きである。

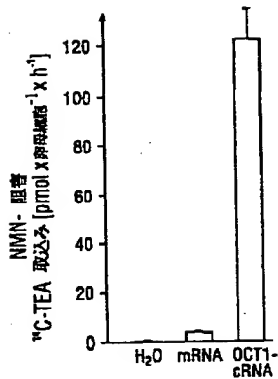
【図15】図14の配列の続きである。

【図16】9アミノ酸の窓を用いたOCT1のKyte/Doo
little疎水性/親水性分析について示している。推定貫
膜領域は番号1~11である。

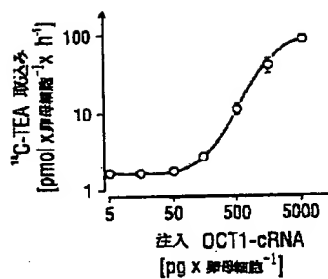
【図17】OCT1の概略を示している。アミノ酸残基
Arg、LysおよびHisはプラス記号で示し、アミ
ノ酸残基GluおよびAspはマイナス記号で示してい
る。第一親水性ループにおける潜在的グリコシル化部位
が確認された。

【図18】様々なラット組織および一部の細胞系にお
けるOCT1特異性mRNAの位置を示している。

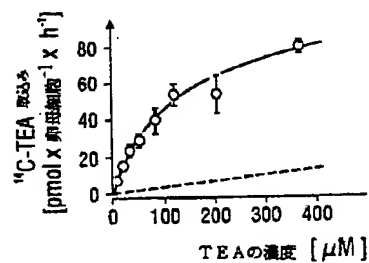
【図1】



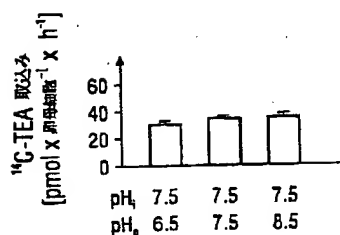
【図2】



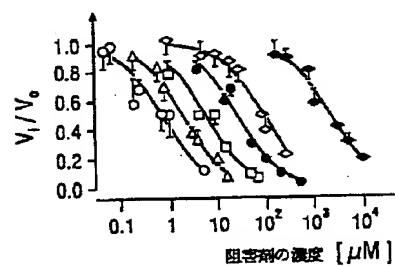
【図3】



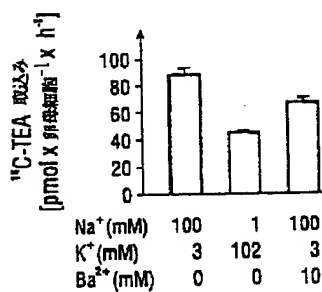
【図5】



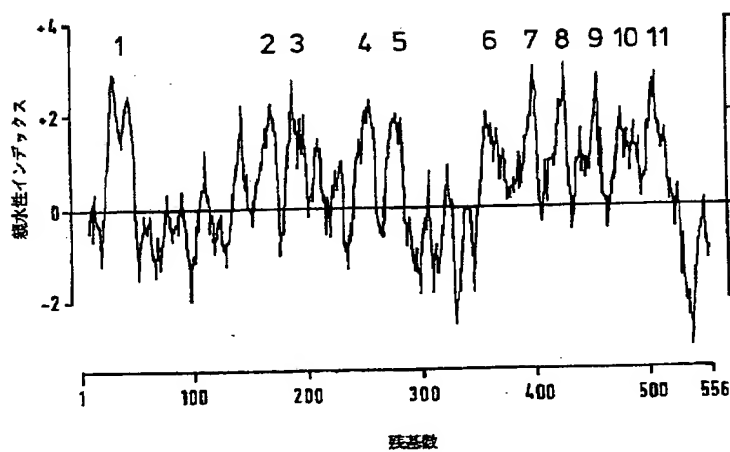
【図6】



【図4】



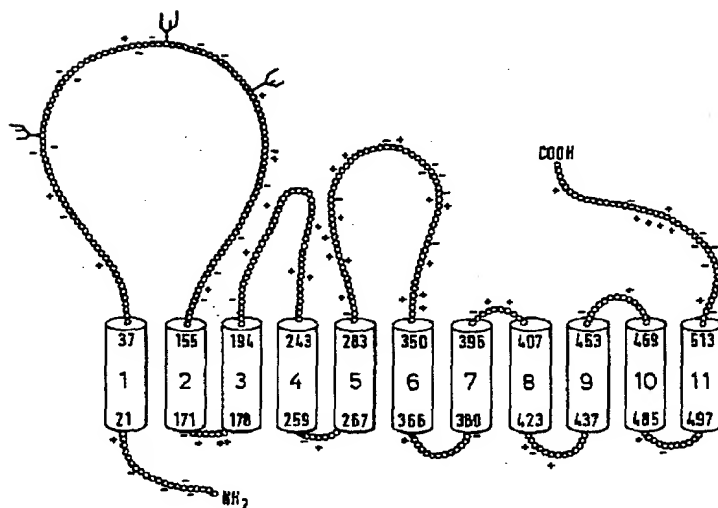
【図16】



【図7】

1 GCAGGCCTGGCTAAACTGGTGAGGGCCCTACCCAGCCATGCCACCGTGCATGATGTCCT
 MetProThrValAspAspValLeu
 61 GGAGCAAGTTGGAGAGTTTGGCTGGTTCCAGAAACAAGCCTTCCTGTTGCTATGCCTGAT
 9 GluGlnValGlyGluPheGlyTrpPheGlnLysGlnAlaPheLeuLeuLeuCysLeuIle
 121 CTCAGCTTCTTTAGCTCCCATCTATGTGGGCATCGTCTTCCTGGGCTTCACCCCTGGACA
 29 SerAlaSerLeuAlaProIleTyrValGlyIleValPheLeuGlyPheThrProGlyHis
 181 TTATTGCCAGAATCCTGGGGTGGCTGAGCTGAGCCAGCGGTGTGGCTGGAGCCAGGCAGA
 49 TyrCysGlnAsnProGlyValAlaGluLeuSerGlnArgCysGlyTrpSerGlnAlaGlu
 241 GGAGCTGAACCTACACTGTGCCGGGCTGGGACCTTCGGACGAGGCCTCCTTCCTCAGCCA
 69 GluLeuAsnTyrThrValProGlyLeuGlyProSerAspGluAlaSerPheLeuSerGln
 *
 301 GTGCATGAGGTATGAGGTGGACTGGAACCAGAGCACCCCTTGACTGTGTGGACCCACTGTC
 89 CysMetArgTyrGluValAspTrpAsnGlnSerThrLeuAspCysValAspProLeuSer
 *
 361 CAGCCTGGTTGCCAACAGGAGTCAGTTGCCATTGGGCCCCCTGCGAGCATGGCTGGGTATA
 109 SerLeuValAlaAsnArgSerGlnLeuProLeuGlyProCysGluHisGlyTrpValTyr
 *
 421 CGACACTCCCGGCTCCTCCATCGTCACTGAGTTTAACCTGGTGTGTGGAGACGCCTGGAA
 129 AspThrProGlySerSerIleValThrGluPheAsnLeuValCysGlyAspAlaTrpLys
 481 AGTGGACCTTTTTTCAGTCCTGTGTGAACCTGGGCTTCTTCCTGGGCTCCCTGTTGTGGG
 149 ValAspLeuPheGlnSerCysValAsnLeuGlyPhePheLeuGlySerLeuValValGly
 541 TTACATTGCAGACAGGTTTGGCCGTAAGCTCTGTCTCTTGGTGACCACGCTGGTCACATC
 169 TyrIleAlaAspArgPheGlyArgLysLeuCysLeuLeuValThrThrLeuValThrSer

【図17】



【図8】

601 TGTGTCCGGTGTGCTAACAGCGGTGGCCCCAGACTATACATCCATGTTGCTCTTTCGCCT
 189 ValSerGlyValLeuThrAlaValAlaProAspTyrThrSerMetLeuLeuPheArgLeu
 661 GCTGCAGGGCATGGTCAGCAAGGGCAGCTGGGTGTCCGGCTATACCTTGATCACAGAGTT
 209 LeuGlnGlyMetValSerLysGlySerTrpValSerGlyTyrThrLeuIleThrGluPhe
 721 TGTCCGGCTCTGGCTACAGGAGAACGACGGCCATTTTGTACCAGATGGCCTTCACAGTGGG
 229 ValGlySerGlyTyrArgArgThrThrAlaIleLeuTyrGlnMetAlaPheThrValGly
 781 GCTAGTGGGGCTTGCCGGGGTGGCCTATGCCATTCCAGACTGGCGCTGGCTCCAGCTAGC
 249 LeuValGlyLeuAlaGlyValAlaTyrAlaIleProAspTrpArgTrpLeuGlnLeuAla
 841 TGTGTCCCTGCCTACCTTCCTCTTCCTGCTGTATTACTGGTTTGTCCCAGAATCCCCCG
 269 ValSerLeuProThrPheLeuPheLeuLeuTyrTyrTrpPheValProGluSerProArg
 901 GTGGCTGTTGTCCCAGAAGAGAACCACGCGAGCTGTCAGGATAATGGAGCAAATTGCACA
 289 TrpLeuLeuSerGlnLysArgThrThrArgAlaValArgIleMetGluGlnIleAlaGln
 961 GAAGAACGGGAAGGTGCCTCCTGCTGACCTGAAGATGCTCTGCCTTGAGGAGGATGCCTC
 309 LysAsnGlyLysValProProAlaAspLeuLysMetLeuCysLeuGluGluAspAlaSer
 1021 AGAAAAGCGAAGTCCTTCGTTTGGCCGACCTGTTCCGCACTCCCAACCTGAGGAAGCACAC
 329 GluLysArgSerProSerPheAlaAspLeuPheArgThrProAsnLeuArgLysHisThr
 1081 CGTCATCCTGATGTATCTATGGTTCTCTTGTGCTGTGCTGTACCAGGGTCTCATCATGCA
 349 ValIleLeuMetTyrLeuTrpPheSerCysAlaValLeuTyrGlnGlyLeuIleMetHis
 1141 CGTGGGAGCCACAGGGGCCAACCTCTACCTGGACTTCTTTTATTCTTCTCTGGTGGAATT
 369 ValGlyAlaThrGlyAlaAsnLeuTyrLeuAspPhePheTyrSerSerLeuValGluPhe

1201 CCGCGGGCCTTCATCATCTGCTACCCATTGACCGCATCTGCCGCATCTACCCAATAGC
389 ProAlaAlaPheIleIleLeuValThrIleAspArgIleGlyArgIleTyrProIleAla

1261 GGCTCGAATCTGGTGACGGGGGACGCTGCCTCCTCATGATCTTTATCCCGCATGAGCT
409 AlaSerAsnLeuValThrGlyAlaAlaCysLeuLeuMetIlePheIleProHisGluLeu

1321 GCACTGGTTGAACGTTACCCTCGCCTGTCTTGGCCGTATGGGGGCCACCATTGTGCTGCA
429 HisTrpLeuAsnValThrLeuAlaCysLeuGlyArgMetGlyAlaThrIleValLeuGlu
*

1381 GATGGTCTGCCTGGTGAACGCTGAGCTGTACCCTACATTCATCAGGAATCTTGGGATGAT
449 MetValCysLeuValAsnAlaGluLeuTyrProThrPheIleArgAsnLeuGlyMetMet

1441 GGTATGCTCTGCCCTGTGTGACCTGGGTGGGATCTTCACCCCCTTCATGGTGTTCAGGCT
469 ValCysSerAlaLeuCysAspLeuGlyGlyIlePheThrProPheMetValPheArgLeu

1501 GATGGAAGTTTGGCAAGCCCTGCCCTCATTTTGTMTTGGGGTTTTGGGCCTGACTGCTGG
489 MetGluValTrpGlnAlaLeuProLeuIleLeuPheGlyValLeuGlyLeuThrAlaGly

1561 GGCCATGACTCTTCTTCTCCCAGAGACCAAGGGTGTGGCTTTGCCTGAGACTATTGAAGA
509 AlaMetThrLeuLeuLeuProGluThrLysGlyValAlaLeuProGluThrIleGluGlu

1621 AGCAGAGAACCTGGGGAGGAGGAAATCAAAGGCCAAAGAAAAACCGATTTACCTTCAGGT
529 AlaGluAsnLeuGlyArgArgLysSerLysAlaLysGluAsnThrIleTyrLeuGlnVal

1681 CCAAACAGGCAAGTCCTCAAGTACCTGACAGGGATGCTGTGCCAGGAGCTGAGTGGCAGA
549 GlnThrGlyLysSerSerSerThr

1741 GAGAAAGGAGGACTTGCCACTTGGAGGATTCCCAGAAGCCTTTGCCTTTCCAGACTCTTG

1801 TATATATGCACCAGGTTCCAAATGAACTACCAACCTTAAAGACTTTTCTGAAAGCCCCAAA

1861 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図10】

```

      10      20      30      40      50      60
GAGGGAGACATTGCACCTGGCCACTGCAGCCCAGACAGGCTCTGGCCACGGCCATGAGCA
      70      80      90     100     110     120
TGCTGAGCCATCATGCCCACCGTGGATGACATTCTGGAGCAGGTTGGGGAGTCTGGCTGG
      METProThrValAspAspIleLeuGluGlnValGlyGluSerGlyTrp
      130     140     150     160     170     180
TTCCAGAAGCAAGCCTTCCTCATCTTATGCCTGCTGTCTGGCTGCCTTTGCGCCCATCTGT
PheGlnLysGlnAlaPheLeuIleLeuCysLeuLeuSerAlaAlaPheAlaProIleCys
      190     200     210     220     230     240
GTGGGCATCGTCTTCCTGGGTTTCACACCTGACCACCACTGCCAGAGCCCTGGGGTGGCT
ValGlyIleValPheLeuGlyPheThrProAspHisHisCysGlnSerProGlyValAla
      250     260     270     280     290     300
GAGCTGAGCCAGCGCTGTGGCTGGAGCCCTGCGGAGGAGCTGAAGTATACAGTCCACGGC
GluLeuSerGlnArgCysGlyTrpSerProAlaGluGluLeuAsnTyrThrValProGly
      310     320     330     340     350     360
CTGGGGCCCCCGGGCGAGGCCTTCCTTGGCCAGTGCAGGCGCTATGAAGTGGACTGGAAC
LeuGlyProAlaGlyGluAlaPheLeuGlyGlnCysArgArgTyrGluValAspTrpAsn
      370     380     390     400     410     420
CAGAGCGCCCTCAGCTGTGTAGACCCCTGGCTAGCCTGGCCACCAACAGGAGCCACCTG
GlnSerAlaLeuSerCysValAspProLeuAlaSerLeuAlaThrAsnArgSerHisLeu
      430     440     450     460     470     480
CCGCTGGGTCCCTGCCAGGATGGCTGGGTGTATGACACGCCCGGCTCTTCCATCGTCACT
ProLeuGlyProCysGlnAspGlyTrpValTyrAspThrProGlySerSerIleValThr
      490     500     510     520     530     540
GAGTTCAACCTGGTGTGTGCTGACTCCTGGAAGCTGGACCTCTTTCAGTCCTGTTTGAAT
GluPheAsnLeuValCysAlaAspSerTrpLysLeuAspLeuPheGlnSerCysLeuAsn
      550     560     570     580     590     600
GCGGGCTTCTTCTTGGCTCTCTCGGTGTTGGCTACTTTGCAGACAGCTTTGGCCGTAAG
AlaGlyPhePhePheGlySerLeuGlyValGlyTyrPheAlaAspArgPheGlyArgLys

```

【図11】

```

610      620      630      640      650      660
CTGTGCTCCTGGGAACTGTGCTGGTCAACCGGTGTCGGCGGTGCTCATGGCCTTCTCG
LeuCysLeuLeuGlyThrValLeuValAsnAlaValSerGlyValLeuMETAlaPheSer

670      680      690      700      710      720
CCCAACTACATGTCCATGCTGCTCTCCGCCTGCTGCAGGGCCTGGTCAGCAAGGGCAAC
ProAsnTyrMETSerMETLeuLeuPheArgLeuLeuGlnGlyLeuValSerLysGlyAsn

730      740      750      760      770      780
TGGATGGCTGGCTACACCTAATCAGAAATTGTTGGCTCGGGCTCCAGAAGAACGGTG
TrpMETAlaGlyTyrThrLeuIleThrGluPheValGlySerGlySerArgArgThrVal

790      800      810      820      830      840
GCGATCATGTACCAGATGGCCTTCACGGTGGGGCTGGTGGCGCTTACCGGGCTGGCCTAC
AlaIleMETTyrGlnMETAlaPheThrValGlyLeuValAlaLeuThrGlyLeuAlaTyr

850      860      870      880      890      900
GCCCTGCCTCACTGGCGCTGGCTGCAGCTGGCAGTCTCCCTGCCACCTTCCTCTCCTG
AlaLeuProHisTrpArgTrpLeuGlnLeuAlaValSerLeuProThrPheLeuPheLeu

910      920      930      940      950      960
CTCTACTACTGCTGTGTCCGGAGTCCCTCGGTGGCTGTATACAAAAAAGAAACACT
LeuTyrTyrTrpCysValProGluSerProArgTrpLeuLeuSerGlnLysArgAsnThr

970      980      990      1000      1010      1020
GAAGCAATAAAGATAATGGACCACATCGCTCAAAAGAATGGGAAGTTGCCTCCTGCTGAT
GluAlaIleLysIleMETAspHisIleAlaGlnLysAsnGlyLysLeuProProAlaAsp

1030      1040      1050      1060      1070      1080
TTAAGATGCTTCCCTCGAAGAGGATGTCACCGAAAAGCTGAGCCCTTCATTTCAGAC
LeuLysMETLeuSerLeuGluGluAspValThrGluLysLeuSerProSerPheAlaAsp

1090      1100      1110      1120      1130      1140
CTGTTCCGCACGCCCGCCTGAGGAAGCGCACCTTCATCCTGATGTACCTGTGGTTCACG
LeuPheArgThrProArgLeuArgLysArgThrPheIleLeuMETTyrLeuTrpPheThr

1150      1160      1170      1180      1190      1200
GACTCTGTGCTCTATCAGGGCTCATCCTGCACATGGGCGCCACCAGCGGGAACCTCTAC
AspSerValLeuTyrGlnGlyLeuIleLeuHisMETGlyAlaThrSerGlyAsnLeuTyr

1210      1220      1230      1240      1250      1260
CTGGATTTCCTTACTCCGCTCTGGTCGAAATCCCGGGGCTTCATAGCCCTCATCACC
LeuAspPheLeuTyrSerAlaLeuValGluIleProGlyAlaPheIleAlaLeuIleThr

```

【図12】

```

1270      1280      1290      1300      1310      1320
ATTGACCGCGTGGGCGCATCTACCCCATGGCCGTGTCAAATTTGTGGCGGGGGCAGCC
IleAspArgValGlyArgIleTyrProMETAlaValSerAsnLeuLeuAlaGlyAlaAla

1330      1340      1350      1360      1370      1380
TGCCTCGTCATTTTTATCTCACCTGACCTGCACTGGTTAAACATCATAATCATGTGTGT
CysLeuValIlePheIleSerProAspLeuHisTrpLeuAsnIleIleIleMETCysVal

1390      1400      1410      1420      1430      1440
GGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAGCTGTAC
GlyArgMETGlyIleThrIleAlaIleGlnMETIleCysLeuValAsnAlaGluLeuTyr

1450      1460      1470      1480      1490      1500
CCCACATTTCGTAGGAACCTCAGAGTGATGGTGTGTTCCCTCCTGCTGACATAGGTGGG
ProThrPheValArgAsnLeuArgValMETValCysSerSerLeuCysAspIleGlyGly

1510      1520      1530      1540      1550      1560
ATAATCACCCCTTCATAGTCTTCAGGCTGAGGGAGGTCTGGCAAGCCTTGCCCTCATT
IleIleThrProPheIleValPheArgLeuArgGluValTrpGlnAlaLeuProLeuIle

1570      1580      1590      1600      1610      1620
TTGTTTGGCGGTGTTGGGCCTGCTTGCCGCGGGAGTGACGCTACTTCTCCAGAGACCAAG
LeuPheAlaValLeuGlyLeuLeuAlaAlaGlyValThrLeuLeuLeuProGluThrLys

1630      1640      1650      1660      1670      1680
GGGGACGCTTTGCCAGAGACCATGAAGGACGCCGAGAACCCTGGGAGAAAAGCAAAGCCC
GlyAspAlaLeuProGluThrMETLysAspAlaGluAsnLeuGlyArgLysAlaLysPro

1690      1700      1710      1720      1730      1740
AAAGAAAACACGATTTACCTTAAGGTCCAAACCTCAGAACCCTCGGGCACCTGAGAGAGA
LysGluAsnThrIleTyrLeuLysValGlnThrSerGluProSerGlyThr

1750      1760      1770      1780      1790      1800
TGTTTTGCGCGATGTCGTGTTGGAGGGATGAAGATGGAGTTATCCTCTGCAGAAATCC

1810      1820      1830      1840      1850      1860
TAGACGCCTTCACTTCTCTGTATTCTTCCTCATACTTGCCTACCCCCAAATTAATATCAG

1870      1880
TCCTAAAGAAAAAAAAAAAAAAAA

```

【図13】

```

-----
      10      20      30      40      50      60
GGCCCTGCCCTGAAGGCTGGTCACTTGCAGAGGTAAACTCCCCTCTTTGACTTCTGGCCA

      70      80      90      100     110     120
GGGTTTGTGCTGAGCTGGCTGCAGCCGCTCTCAGCCTCGCTCCGGGCACGTCGGGCAGCC

      130     140     150     160     170     180
TCGGGCCCTCCTGCCTGCAGGATCATGCCACCAACCGTGGACGATGTCCTGGACATGGA
      METProThrThrValAspAspValLeuGluHisGly

      190     200     210     220     230     240
GGGGAGTTTCACTTTTCCAGAAGCAAATGTTTTCCTCTTGCTCTGCTCTCGGCTACC
GlyGluPheHisPhePheGlnLysGlnMETPhePheLeuLeuAlaLeuLeuSerAlaThr

      250     260     270     280     290     300
TTCGGCCCCATCTACGTGGGCATCGTCTTCTGGGCTTCACCCCTGACCACCGCTGCCGG
PheAlaProIleTyrValGlyIleValPheLeuGlyPheThrProAspHisArgCysArg

      310     320     330     340     350     360
AGCCCCGGAGTGGCCGAGCTCACTCTGCGCTGCGGCTGGAGTCCTGCAGAGGAACTGAAC
SerProGlyValAlaGluLeuSerLeuArgCysGlyTrpSerProAlaGluGluLeuAsn

      370     380     390     400     410     420
TACACGCTGCCGGGCCAGGACCTGCGGGCGAAGCCTCCCAAGACAGTGTAGGCGCTAC
TyrThrValProGlyProGlyProAlaGlyGluAlaSerProArgGlnCysArgArgTyr

      430     440     450     460     470     480
GAGGTGGACTGGAACAGAGCACCTTTGACTGCGTGGACCCCTGGCCAGCCTGGACACC
GluValAspTrpAsnGlnSerThrPheAspCysValAspProLeuAlaSerLeuAspThr

      490     500     510     520     530     540
AACAGGAGCCGCTGCCACTGGGCCCCCTGCCGGGACGGCTGGGTGTACGAGACGCCTGGC
AsnArgSerArgLeuProLeuGlyProCysArgAspGlyTrpValTyrGluThrProGly

      550     560     570     580     590     600
TCGTCCATCGTCACCGAGTTTAACTGGTATGTGCCAACTCCTGGATGTTGGACCTATTC
SerSerIleValThrGluPheAsnLeuValCysAlaAsnSerTrpMETLeuAspLeuPhe

```

【図14】

```

        610      620      630      640      650      660
CAGTCATCAGTGAATGTAGGATTCTTTATTGGCTCTATGAGTATCGGCTACATAGCAGAC
GlnSerSerValAsnValGlyPhePheIleGlySerMETSerIleGlyTyrIleAlaAsp

        670      680      690      700      710      720
ACGTTTGGCCGTAAGCTCTGCCTCCTAACTACAGTCCTCATAAATGCTGCAGCTGGAGTT
ArgPheGlyArgLysLeuCysLeuLeuThrThrValLeuIleAsnAlaAlaAlaGlyVal

        730      740      750      760      770      780
CTCATGGCCATTTCCTCAACCTATACGTGGATGTTAATTTTCGCTTAATCCAAGGACTG
LeuMETAlaIleSerProThrTyrThrTrpMETLeuIlePheArgLeuIleGlnGlyLeu

        790      800      810      820      830      840
GTCAGCAAAGCAGGCTGGTTAATAGGCTACATCCTGATTACAGAATTTGTTGGGGGGAGA
ValSerLysAlaGlyTrpLeuIleGlyTyrIleLeuIleThrGluPheValGlyGlyArg

        850      860      870      880      890      900
TATCGGAGAACACTCGGGATTTTTACCAAGTTGCCTATACAGTTGGGCTCCTGGTGCTA
TyrArgArgThrValGlyIlePheTyrGlnValAlaTyrThrValGlyLeuLeuValLeu

        910      920      930      940      950      960
GCTGGGGTGGCTTACGCACTTCCTCACTGGAGCTGGTTGCAGTTCACAGTTGCTCTGCCC
AlaGlyValAlaTyrAlaLeuProHisTrpArgTrpLeuGlnPheThrValAlaLeuPro

        970      980      990      1000      1010      1020
AACTTCTTCTTCTTGCTCTATTACTGGTGCACTACCTGAGTCTCCAGGTGGCTGATCTCC
AsnPhePhePheLeuLeuTyrTyrTrpCysIleProGluSerProArgTrpLeuIleSer

        1030      1040      1050      1060      1070      1080
CACAATAAGAAATGCTGAAGCCATGAGAATCATTAAAGCACATCGCAAAGAAAAATGAAAA
GlnAsnLysAsnAlaGluAlaMETArgIleIleLysHisIleAlaLysLysAsnGlyLys

        1090      1100      1110      1120      1130      1140
TCTCTACCGGCTCCCTTCAGCGCCTGAGACTTGAAGAGGAACTGGCAAGAAATTGAAC
SerLeuProAlaSerLeuGlnArgLeuArgLeuGluGluGluThrGlyLysLysLeuAsn

        1150      1160      1170      1180      1190      1200
CCTTCATTTCTTGACTTGGTCAGAACTCCTCAGATAAGGAAACATACTATGATATTGATG
ProSerPheLeuAspLeuValArgThrProGlnIleArgLysHisThrMETIleLeuMET

        1210      1220      1230      1240      1250      1260
TACAAGTGGTTCACGAGCTCTGTGCTCTACCAGGGCCTCATCATGCACATGGGCCTTGCA
TyrAsnTrpPheThrSerSerValLeuTyrGlnGlyLeuIleMETHisMETGlyLeuAla

```


【図15】

```

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
      |         |         |         |         |         |
GCTGACAATATCTACCTGCATTCTTCTACTCTGCCCTGGTTGAATGCCAGCTGCCTTC
GlyAspAsnIleTyrLeuAspPhePheTyrSerAlaLeuValGluPheProAlaAlaPhe

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
      |         |         |         |         |         |
ATGATCATCCTCATTATCGACCGCATCGGACCGCTTACCCTTGGGCTGCATCAAATATC
METIleIleLeuIleIleAspArgIleGlyArgArgTyrProTrpAlaAlaSerAsnMET

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
      |         |         |         |         |         |
GTTGCAGGGGCAGCCTGTCTGGCCTCAGTTTTTATACCTGGTGATCTACAATGGCTAAAA
ValAlaGlyAlaAlaCysLeuAlaSerValPheIleProGlyAspLeuGlnTrpLeuLys

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
      |         |         |         |         |         |
ATTATTATCTCATGCTTGGGAAGAATGGGGATCACAATGGCCTATGACATAGTCTGCCTG
IleIleIleSerCysLeuGlyArgMETGlyIleThrMETAlaTyrGluIleValCysLeu

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
      |         |         |         |         |         |
GTCAATGCTGAGCTGTACCCACATTTCATTAGGAATCTTGGCGTCCACATCTGTTCTCTCA
ValAsnAlaGluLeuTyrProThrPheIleArgAsnLeuGlyValHisIleCysSerSer

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
      |         |         |         |         |         |
ATGTGTGACATTGGTGGCATCATCAGCCATTCTGGTCTACCGGCTCACTAACATCTGG
METCysAspIleGlyGlyIleIleThrProPheLeuValTyrArgLeuThrAsnIleTrp

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
      |         |         |         |         |         |
CTTGAGCTCCCGCTGATGGTTTTTCGGCGTACTTGGCTTGGTTGCTGGAGGTCTGGTGCTG
LeuGluLeuProLeuMETValPheGlyValLeuGlyLeuValAlaGlyGlyLeuValLeu

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
      |         |         |         |         |         |
TTGCTTCCAGAACTAAAGGGAAAGCTTTGCCTGAGACCATCGAGGAAGCCGAAAAATATG
LeuLeuProGluThrLysGlyLysAlaLeuProGluThrIleGluGluAlaGluAsnMET

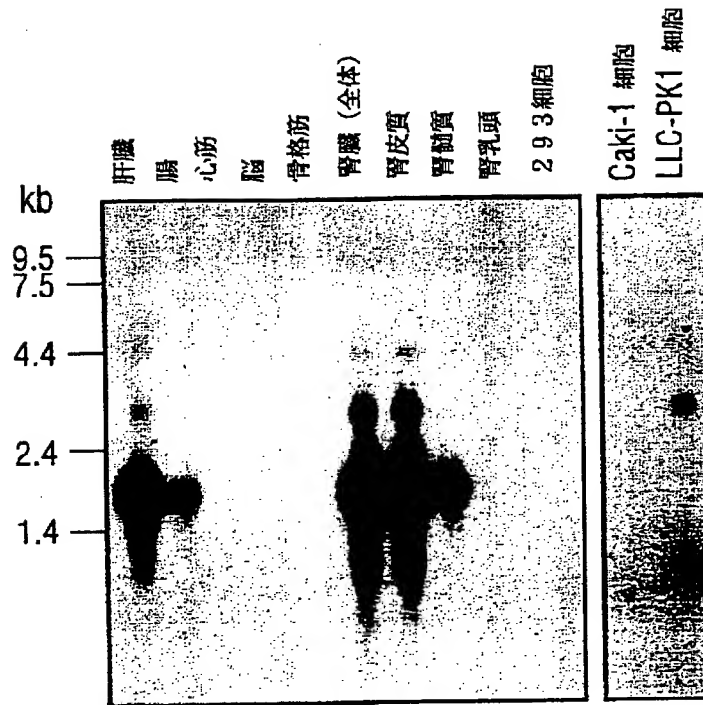
      1750      1760      1770      1780      1790      1800
      |         |         |         |         |         |
CAAAGACCAAGAAAAATAAGAAAAAGATGATTTACCTCCAAGTTCAGAACTAGACATT
GlnArgProArgLysAsnLysGluLysMETIleTyrLeuGlnValGlnLysLeuAspIle

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
      |         |         |         |         |         |
CCATTGAACTAAGAAGAGAGACCGTTGCTGCTGTCATGACCTAGCTTTATGGCAGCAAGA
ProLeuAsn

      1870      1880      1890
      |         |         |
CCAAAAGTAGAAATCCCTGCACTCATCAGAAAGCCC

```

【図18】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 21/04		B		
C 1 2 N 5/10				
15/09				
C 1 2 P 21/02	Z N A	C 9282-4B		
C 1 2 Q 1/68		A 9453-4B		
// A 6 1 K 39/395		D		
(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				
		9281-4B	C 1 2 N 15/00	A
			(C 1 2 N 5/00	B
			C 1 2 R 1:91)	